

FR 00/430



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 17 MARS 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

<p>DATE DE REMISE DES PIÈCES 22 FEV 1999</p> <p>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 9902167</p> <p>DÉPARTEMENT DE DÉPÔT 75 INPI PARIS</p> <p>DATE DE DÉPÔT 22 FEV. 1999</p>		<p>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</p> <p>CABINET REGIMBEAU 26, Avenue Kléber 75116 PARIS</p>	
<p>2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire</p> <p><input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen</p> <p><input type="checkbox"/> demande initiale</p> <p><input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n°</p> <p>Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat</p> <p>Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non</p> <p>Titre de l'invention (200 caractères maximum)</p> <p>Procédé d'obtention d'une préparation virale purifiée</p>		<p>n° du pouvoir permanent 237870 013010 TW références du correspondant 01 45 00 92 02 téléphone</p> <p>date</p>	
<p>3 DEMANDEUR (S) n° SIREN</p> <p>Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination</p> <p>TRANSGENE S.A.</p> <p>Nationalité (s) Française</p> <p>Adresse (s) complète (s)</p> <p>11, rue de Moelsheim 67000 STRASBOURG</p>		<p>code APE-NAF</p> <p>Forme juridique</p> <p>SOCIÉTÉ ANONYME</p> <p>Pays</p> <p>FR</p>	
<p>4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée</p>			
<p>5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission</p>			
<p>6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE</p> <p>pays d'origine numéro date de dépôt nature de la demande</p>			
<p>7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date</p>			
<p>8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire)</p> <p><i>[Signature]</i> 9902167</p>		<p>SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI</p> <p><i>[Signature]</i></p>	

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9902167

TITRE DE L'INVENTION :

Procédé d'obtention d'une préparation virale purifiée

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

TRANSGENE S.A.

11, rue de Molsheim 67000 STRASBOURG

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

KOEHL Michel

5, Quai Saint Thomas
67000 Strasbourg, FR

GAILLAC David

6, rue du Béarn
67000 Strasbourg, FR

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

22 février 1999

CABINET REGIMBEAU

[Signature]

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDECATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
p4				24/8/99	J P M - 30 AOUT 1999

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

La présente invention a pour objet un nouveau procédé de purification d'une préparation virale. L'invention présente un intérêt tout particulier dans la perspective d'applications dans le domaine de la thérapie génique, appliquée notamment à l'homme.

5 La thérapie génique se définit comme le transfert d'information génétique présentant un intérêt thérapeutique ou vaccinal dans une cellule ou un organisme hôte en vue d'obtenir dans cette cellule ou cet organisme un effet thérapeutique ou vaccinal. Le premier protocole appliqué à l'homme a été initié aux Etats Unis en septembre 1990 sur un patient présentant une immunodéficience liée à une mutation du gène codant pour l'Adénine Désaminase (ADA). Dans
10 ce cadre particulier, il s'agissait de remplacer le gène défectueux, dont le dysfonctionnement était à l'origine de la maladie génétique, par un gène fonctionnel. Le succès relatif de cette première expérimentation a encouragé le développement de cette technologie dont l'application a depuis été étendue au traitement d'autres maladies aussi bien génétiques qu'acquises (cancers, maladies infectieuses telles que par exemple le SIDA).

15 La mise en oeuvre des protocoles de thérapie génique repose principalement sur l'utilisation de vecteurs qui permettent le transfert, et éventuellement l'expression, de l'information génétique d'intérêt, ou gène, dans une cellule ou un organisme hôte. De nombreux vecteurs d'origine virale et non-virale ont été développés au cours des dernières années et ont fait l'objet de nombreuses publications accessibles à l'homme du métier (par exemple voir Robbins et al.,
20 1998, Tibtech, 16, 35-40 et Rolland, 1998, Therapeutic Drug Carrier Systems, 15, 143-198).

L'intérêt des virus utilisés à titre de vecteurs de thérapie génique a déjà été évoqué dans l'art antérieur. Parmi les virus les plus couramment utilisés, les adénovirus constituent des vecteurs de choix car ils peuvent être utilisés dans le cas de nombreux types cellulaires, qu'il s'agisse de cellules en division ou quiescentes, ils sont non intégratifs et peu pathogènes. Ainsi
25 que le décrivent les demandes de brevets n° WO 94/28152 ou WO 94/12649, ils trouvent de nombreuses applications dans le domaine de la thérapie génique. Toutefois, les propriétés de nombreux autres virus ont également été exploitées pour la mise au point de vecteurs viraux de thérapie génique. A titre d'exemple, on peut citer les vecteurs poxviraux, et plus particulièrement les vecteurs dérivés du virus de la vaccine ou du Virus Modifié d'Ankara (MVA ; EP 324350), les
30 vecteurs rétroviraux (Naldini et al., 1996, Science, 272, 263-267), etc...

Les virus, et notamment les adénovirus, actuellement utilisés dans les protocoles de thérapie génique sont des virus dont le génome a été modifié (par délétion, mutation,...) de manière à affecter leur propriété répliquative dans le but d'éviter leur propagation dans l'environnement ou l'organisme hôte, à réduire leur propriété immunogène et à permettre
35 l'introduction de séquences nucléiques hétérologues d'intérêt. Plus particulièrement, comme le décrit notamment la demande de brevet WO 94/28152, le génome de ces virus peut être

spécifiquement délété de régions essentielles à l'obtention de particules virales infectieuses. De même, les demandes de brevet EP83286, EP110385, US5185146, WO9702355 décrivent l'identification de formes virales naturellement atténuées qui peuvent être exploitées pour l'élaboration de vecteurs viraux. Un virus dans le génome duquel est introduit au moins un gène d'intérêt est appelé «virus recombiné» et par extension «vecteur recombiné» ; plus particulièrement de tels virus recombinés comprennent également les éléments appropriés pour l'expression de ces gènes dans les cellules ou organismes hôtes.

Les virus présentent la caractéristique de se multiplier essentiellement de manière intracellulaire. Par ailleurs, dans le cadre de la mise en oeuvre de protocoles de thérapie génique, il est nécessaire de disposer de particules virales, notamment infectieuses, qui renferment un vecteur d'intérêt, notamment recombiné, associé à des polypeptides spécifiques et qui sont utilisables comme produit pour la thérapie génique. Des procédés pour la production de particules virales utilisables dans le cadre de protocoles de thérapie génique sont connus qui comprennent les étapes suivantes:

- (i) obtention d'une préparation virale brute ,
- (ii) purification de ladite préparation virale brute.

La préparation virale brute est obtenue selon les étapes suivantes :

(a) infection ou transfection d'une lignée cellulaire appropriée par au moins un vecteur viral d'intérêt, préférentiellement recombiné ;

(b) culture de ladite lignée cellulaire infectée ou transfectée dans des conditions permettant la replication virale et la production de particules virales ;

(c) collecte des cellules,

(d) étape facultative de traitement des cellules, notamment selon un protocole de lyse cellulaire, de façon à libérer les particules virales intracellulaires produites, en particulier lorsque les particules virales produites ne sont pas libérées dans le milieu pendant l'étape de culture;

(e) et éventuellement un traitement supplémentaire du mélange obtenu à l'étape (c) ou (d) par une DNase destiné à limiter la quantité d'ADN cellulaire et à réduire la viscosité du mélange.

Outre les particules virales produites dans les cellules, la préparation virale brute comprend aussi toute sorte de constituants, débris cellulaires, toxines, etc...qu'il est nécessaire d'éliminer par la mise en oeuvre d'une ou plusieurs étapes de purification permettant d'obtenir une préparation

renfermant des particules virales purifiées utilisables en thérapie génique.

Selon les procédés connus de l'art antérieur, la purification de la préparation virale brute est réalisée soit par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium (Huyghe, B et al., 1995, Human Gene Therapy, 6, 1403-1416), soit par adsorption en lit paqué (Huyghe, B et al., 1995, Human Gene Therapy, 6, 1403-1416).

L'ultracentrifugation sur gradient de chlorure de césium présente de nombreux inconvénients. En effet, le chlorure de césium est un composé toxique incompatible avec un usage thérapeutique chez l'homme qu'il convient d'éliminer par une étape supplémentaire de purification. Par ailleurs, cette technique d'ultracentrifugation sur gradient de chlorure de césium est surtout adaptée au traitement de volumes réduits de préparation virale brute. En effet, les dispositifs d'ultracentrifugation permettent seulement le traitement de l'ordre de 600 ml de préparation virale brute. Si de tels volumes sont bien adaptés à des productions destinées aux travaux de recherche, ils ne permettent pas de répondre de manière satisfaisante aux contraintes d'une production industrielle. Enfin, le temps nécessaire à la mise en oeuvre de cette technique de purification par ultracentrifugation, environ 40 heures, est également un élément très limitant dans des perspectives de productions industrielles. Chacun de ces inconvénients indique que cette technique de purification d'une préparation virale brute est incompatible avec les exigences de rendement et de coût requises par les industriels.

La méthode de purification par adsorption en lit paqué repose sur l'utilisation de particules d'adsorbant sédimentées ou compactées les unes aux autres, disposées dans une colonne de chromatographie. Selon ce procédé de purification, la préparation virale brute à purifier est déposée sur la colonne et les particules virales sont purifiées par éluions différentielles successives. Toutefois, étant donné la composition complexe de la préparation virale brute, comprenant notamment des débris cellulaires, la colonne de chromatographie se colmate fréquemment rendant la purification laborieuse et inefficace. Afin d'éviter ce colmatage, il est possible de procéder, avant le dépôt de la préparation sur la colonne de chromatographie, à une étape de clarification de ladite préparation virale brute afin d'éliminer les débris cellulaires. Il est également proposé de réaliser des étapes de concentration, d'ajustement du pH ou de la conductivité de la préparation virale brute avant son passage sur la colonne. Ces étapes supplémentaires et indispensables entraînent une baisse du rendement global du procédé de purification qui ne permet pas d'obtenir des rendements de production compatibles avec une exploitation industrielle satisfaisante.

Dans ce contexte, il serait avantageux de pouvoir disposer d'une nouvelle méthode pour la préparation, à partir de cultures cellulaires, de particules virales suffisamment purifiées pour permettre leur utilisation en thérapie génique. Plus particulièrement, les procédés décrits jusque-

là ne sont pas satisfaisants en ce qu'ils comprennent des étapes limitantes au niveau du volume de préparation virale brute à purifier (ultracentrifugation) et / ou par leur nombre trop important qui se traduit par une baisse du rendement global de l'ordre de 5 à 20% ne permettant pas de satisfaire une exploitation à l'échelle industrielle.

5 On a maintenant mis au point un nouveau procédé de purification d'une préparation virale brute parfaitement adapté à la production industrielle de particules virales destinées aux applications de thérapie génique.

10 La présente invention concerne en premier lieu un procédé de purification d'une préparation virale brute, renfermant des particules virales d'intérêt, notamment adénovirales, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une étape d'adsorption en lit fluidisé.

 Le principe de l'adsorption en lit fluidisé est brièvement exposé ci-après. Des explications plus détaillées sont disponibles dans « Expanded Bed Adsorption , Principles and Methods » - Pharmacia Biotech - Edition AA ainsi que dans le brevet US 5,522,993 dont les contenus font partie de la présente description.

15 A l'inverse de l'adsorption en lit paqué pour laquelle des particules solides d'adsorbant sont sédimentées ou compactées les unes contre les autres, l'adsorption en lit fluidisé repose sur le principe selon lequel des particules solides d'adsorbant comprises dans ledit lit fluidisé sont maintenues en suspension dans un fluide (gazeux ou liquide) générant ainsi entre elles des espaces libres. Cette suspension des particules d'adsorbant est obtenue par l'action d'une ou
20 plusieurs forces (mécanique, électromagnétique, magnétique, gravitationnelle, électrique...). La suspension des particules d'adsorbant dans un fluide liquide ou gazeux peut par exemple être obtenue par la combinaison d'un courant dudit fluide dirigé de manière opposée au champ gravitationnel auquel sont naturellement soumises les particules d'adsorbant. La direction et l'intensité des deux forces sont aisément choisies par l'homme de l'art afin de maintenir les
25 particules d'adsorbant en suspension. De même, il est possible d'utiliser des particules d'adsorbant qui présentent une composition particulière qui les rend sensibles à une force magnétique ou/et électrique et permet ainsi d'obtenir une suspension de particules d'adsorbant comme précédemment décrite. Enfin, il est également possible de disposer de particules
30 d'adsorbant qui présentent elles-mêmes une charge magnétique ou électrique suffisante pour permettre leur mise en suspension dans des conditions appropriées. L'homme du métier dispose des connaissances nécessaires à la réalisation de ces variantes de l'invention.

 L'expansion, ou mise en suspension, des particules d'adsorbant génère l'apparition d'espaces entre lesdites particules qui permettent le passage des cellules, débris cellulaires ou autres particules indésirables que l'on souhaite éliminer de la préparation virale brute.

Selon la présente invention, les particules d'adsorbant utilisées dans l'étape d'adsorption en lit fluidisé sont notamment sélectionnées parmi des particules constituées :

- de matériaux composites, organiques et/ou inorganiques, tels que par exemple la silice, la dextrane-silice ou la cellulose-titane-dioxyde (Gillcrist et al., 1994, *Separations for Biotechnology*, 3, pp. 184-190);
- de polymères tels que par exemple l'agarose, le polyacrylamide, le polystyrène ou leurs dérivés (par exemple le poly(N-isopropyl acrylamide), voir CA2147115).

Selon un mode particulier de réalisation, les particules d'adsorbant comprennent en outre un noyau central. Un tel noyau central consiste notamment en un noyau de quartz ou de métal inerte (tel que du zirconium) (Hansson et al., 1994, *Biotechnology*, 12, 285-288 ; Hjorth et al., 1995, *Bioseparation*, 5, 217-223) ou en un noyau dont la composition permet auxdites particules d'adsorbant l'incorporant d'être maintenues en suspension dans le fluide par l'application d'un champ magnétique, électrique ou électromagnétique (voir par exemple "Continuous cell suspension processing using magnetically stabilized fluidized beds" *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 37 pp110-120 (1991) by B.E. Terranova and M.A. Burns).

Selon un cas préféré de l'invention, les particules d'adsorbant portent, directement ou indirectement, au moins un ligand capable de se lier de manière spécifique et réversible à un anti-ligand. Conformément à la présente invention, un tel anti-ligand consiste en tout ou partie d'une particule virale d'intérêt que l'on souhaite purifier à partir d'une préparation virale brute.

Par "ligand", on entend désigner :

- tout ou partie d'un polypeptide, notamment tout ou partie d'un anticorps, capable de se lier de manière spécifique et réversible à tout ou partie d'une protéine de ladite particule virale d'intérêt, notamment une protéine de la capside ou de l'enveloppe, un récepteur membranaire spécifique, un peptide recombinant, une protéine de la membrane externe adénovirale telle que l'hexon, les pentons (Hong et al, 1995, *EMBO J.*, 14, 4714-4727), ou la fibre (Henry et al, 1994, *J.Virol.*, 68, 5239-5246) etc...

- un groupement chargé positivement, notamment un groupement basique, portant par exemple une amine substituée, notamment par des groupes alkyles ; de manière préférée, on choisira un groupement chargé basique sélectionné parmi les groupements diméthylaminoéthyl (DMAE), diéthylaminoéthyl (DEAE), triméthylaminoéthyl (TMAE), le groupement - R- CH(OH) - CH₂ - N⁺ - (CH₃)₃ (également appelé groupement Q ; voir les résins Streamline - Pharmacia), le groupement guanidinium ou encore les groupements imine tels que la polyéthylèneimine (PEI) ;

- un groupement chargé négativement, tel que par exemple un groupement sulfate

de formule $R-SO_4^-$ avec par exemple R = groupes alkyles (par exemple méthyl sulfate) ou un groupement carboxylate de formule $R-COO^-$ avec par exemple R = groupes alkyles (par exemple méthyl carboxylate) ou encore un groupement phosphate de formule $R-PO_4^-$ avec par exemple R = groupes alkyles.

5 De tels ligands chargés positivement ou négativement sont capables de se lier de manière spécifique à des anti-ligands de charge opposée.

Dans le cadre de la présente invention, le ligand préféré est le groupement Q et les particules d'adsorbant préférées sont les résines Streamline® Q XL. (Pharmacia).

10 L'invention concerne également le cas pour lequel ledit ligand est indirectement fixé sur la particule d'adsorbant. Dans ce cas, ledit ligand est fixé par l'intermédiaire d'un bras chimique qui n'interfère pas dans la réactivité dudit ligand à l'égard de l'anti-ligand. De tels bras ainsi que leur utilisation sont largement décrits dans la littérature relative aux synthèses chimiques.

15 Il est également possible de choisir le pH auquel le procédé de l'invention sera réalisé de manière à optimiser la liaison spécifique ligand/anti-ligand, notamment dans le cas où l'on utilise des particules d'adsorbant portant un ligand chargé. Ainsi, dans le cas où l'on choisira d'utiliser des particules d'adsorbant porteuses de groupements basiques, notamment pour la purification de particules adénovirales dont les protéines de surface ont en majorité des points isoélectriques (pI) compris entre 5.3 et 6.0, le pH sera compris entre environ 6 et environ 10, avantageusement entre environ 7.5 et environ 9.5 et, de façon préférée sera d'environ 8.5, de manière à ce que l'essentiel des protéines virales soit chargé négativement et interagisse avec les groupements basiques des particules d'adsorbant. Inversement, lorsque le procédé selon l'invention utilise des particules d'adsorbant portant des groupements chargés négativement, le pH choisi sera compris entre environ 3.0 et environ 5.0. Par ailleurs, il est également possible de travailler à des pH inférieurs au pI des protéines virales, notamment lorsque l'on utilise des particules d'adsorbant portant un ligand chargé négativement. Dans ce cas particulier, il est nécessaire d'utiliser un tampon de conductivité élevée afin de stabiliser les particules virales. L'homme du métier est en mesure d'ajuster le pH par l'utilisation de solutions tamponnées ou par l'ajout de bases ou d'acides pour respectivement augmenter ou réduire le pH selon les besoins.

30 Pour la mise en oeuvre du procédé de l'invention, il est nécessaire que le ligand soit capable de se lier de manière réversible à l'anti-ligand d'intérêt. La dissociation ligand/anti-ligand peut être réalisée par tout moyen approprié et notamment en modifiant la salinité ou le pH du milieu réactionnel.

En outre, selon l'invention, il est possible de suivre le procédé de purification, notamment en

continu, sur les échantillons récoltés et traités selon le procédé de l'invention par tout moyen connu de l'homme de l'art. Il est notamment possible d'effectuer des mesures spectrophotométriques de l'absorbance à 260 nm et 280 nm et de calculer le ratio DO260/DO280 dans chaque échantillon sachant que toute préparation virale purifiée possède un ratio DO 260 / DO 280 caractéristique. A titre indicatif, le ratio DO260/DO280 d'une préparation adénovirale purifiée est de 1,25. Il est également possible de suivre le procédé de purification par la mise en oeuvre de techniques de détection usuelles telles que par exemple des techniques d'électrophorèse, de PCR...

La température à laquelle est mis en oeuvre le procédé selon l'invention est préférentiellement comprise entre -5 et +50°C. Cependant, afin de préserver les propriétés infectieuses des particules virales que l'on souhaite purifier, on préférera une température comprise entre environ +4°C et +37°C et, plus particulièrement, entre environ +15°C et +25°C.

Selon un mode de réalisation préféré, le procédé selon l'invention est réalisé dans des conditions de conductivité comprises entre environ 30 et environ 70 mS/cm, avantageusement entre environ 38 et environ 45 mS/cm et, de préférence, entre environ 40 et environ 43 mS/cm.

Lorsque le lit fluidisé est formé, c'est à dire que les particules d'adsorbant sont en suspension, il est possible que celles-ci soient animées d'un mouvement circulaire permanent connu sous le nom de « rouleaux de recirculation ». Ce phénomène diminue la capacité d'adsorption des particules et doit par conséquent être limité au maximum. Une solution possible consiste à utiliser des particules d'adsorbant de tailles hétérogènes. En effet, la distribution hétérogène des tailles permet aux particules d'adsorbant de plus petit volume de se localiser dans la partie supérieure du dispositif, par exemple une colonne, qui les renferme. Au contraire, les particules les plus grosses sont localisées dans la partie inférieure dudit dispositif ce qui permet de réduire de manière importante la mobilité des particules.

Par conséquent, de manière préférentielle, les particules d'adsorbant selon l'invention seront choisies de façon à se qu'elles présentent des tailles hétérogènes.

Une autre solution permettant d'éviter la formation de rouleaux de recirculation consiste à compartimenter le dispositif afin de limiter les possibilités de mouvement des particules d'adsorbant (A. Buijs and J.A. Wesselingh, 1980, Journal of Chromatography, vol.201 pp 319-327).

Comme évoqué ci-dessus, pour la mise en oeuvre du procédé selon l'invention, les particules d'adsorbant sont maintenues en suspension dans un dispositif. De manière avantageuse, ledit dispositif est de forme cylindrique et de manière préférée il s'agit d'une colonne de chromatographie. Dans un mode de réalisation préféré du procédé selon l'invention, on choisira une colonne de chromatographie telle que décrite dans le brevet US 5, 522, 993. Cette colonne présente à chacune de ses extrémités au moins une entrée ou une sortie par lesquelles circulent les solutions

d'effluent et d'éluant entrant et sortant de la colonne. Selon ce cas particulier, les particules d'adsorbant sont dans un premier temps soumises à une phase d'expansion, notamment par application dans la colonne de chromatographie d'un courant de tampon ascendant obtenu en introduisant le tampon par l'entrée localisée à l'extrémité inférieure de la colonne et en l'évacuant par la sortie située à l'extrémité supérieure. Cette phase d'expansion est maintenue jusqu'à l'obtention d'un « lit fluidisé », c'est à dire d'un équilibre entre la force de la gravité terrestre qui attire les particules d'adsorbant vers l'extrémité inférieure de la colonne, et les forces d'entraînement du courant ascendant du tampon qui sont dirigées vers l'extrémité supérieure de la colonne.

Conformément à la présente invention, la préparation virale brute est soumise à un procédé de purification comprenant une étape au moins d'adsorption en lit fluidisé. Plus particulièrement lorsque le dispositif est une colonne, après obtention du « lit fluidisé », la préparation virale brute à purifier est déposée sur la colonne. Dans le cas préféré de l'invention pour lequel ladite colonne est telle que décrite dans le brevet US 5, 522, 993, la préparation virale brute est introduite dans la partie inférieure de cette colonne. Ensuite, la préparation virale brute est lavée par passage de tampon. Dans le cas préféré, le passage de tampon est effectué selon un courant ascendant. Après la phase de lavage, le flux de tampon est stoppé afin de permettre aux particules d'adsorbant de sédimenter. Selon un cas préféré, cette phase de sédimentation est assistée par un flux de tampon descendant. Une étape d'élution est alors conduite par application d'un flux de tampon, notamment descendant, dans des conditions de concentration, de pH et/ou de conductivité que l'homme du métier est en mesure d'adapter afin de permettre le relargage des particules virales adsorbées sur les particules adsorbantes. De même, il est à la portée de l'homme de l'art d'adapter les conditions de chromatographie en fonction de différents paramètres, notamment du volume de la colonne, des particules adsorbantes choisies, de la concentration virale, de la charge et/ou de la nature des contaminants. L'élution de la préparation virale peut par exemple être réalisée en modifiant la salinité ou le pH de l'éluant.

Selon un mode de réalisation particulier, le procédé de purification de la préparation virale brute selon l'invention peut en outre comprendre une étape de chromatographie en lit paqué, et de manière préférée une étape de chromatographie en gel filtration. Les deux étapes (étape d'adsorption en lit fluidisé et chromatographie en lit paqué) peuvent être réalisées dans un ordre quelconque, toutefois de manière préférée, on procédera en premier lieu à l'étape d'adsorption en lit fluidisé et en second lieu à la chromatographie en lit paqué, notamment à une chromatographie de gel filtration.

Selon l'étape de chromatographie de gel filtration, l'échantillon est traité sur un support solide comprenant des billes de diamètre compris entre 3 et 160 μm , avantageusement entre 5 et 105 μm et de préférence entre 10 et 80 μm . De préférence, ce support a une porosité proche de la taille du

virus afin que celui-ci ne pénètre pas dans les billes. Au contraire, les molécules de taille inférieure pénètrent dans les billes et leur migration est retardée. Différents types de supports peuvent être utilisés tels que les matrices à base d'agarose (Sépharose), de dextran (gel Séphadex), d'acrylamide (gels Séphacryl et Trisacryl), la silice (gels TSK et SW), de copolymères éthylène glycol méthacrylate (gels Toyopearl HW, TSK et PW) et de mélanges, notamment d'agarose et de dextran (gel Superdex). Les supports mentionnés sont de préférence utilisés sans groupement de fonctionnalisation. Les supports de chromatographie de gel filtration particulièrement appropriés à la mise en œuvre du procédé de préparation selon l'invention sont les suivants :

- matrices allyl dextran-méthylène bis acrylamide (Séphacryl S300 HR de diamètre de bille compris entre 25 et 75 μm , Séphacryl S400 HR de diamètre de bille compris entre 25 et 75 μm , Séphacryl S500 HR de diamètre de bille compris entre 25 et 75 μm et Séphacryl S1000 SF de diamètre de bille compris entre 40 et 105 μm ; Pharmacia),

- matrices d'éthylène glycol-méthacrylate (Toyopearl HW 55, Toyopearl HW 65 et Toyopearl HW 75 de diamètre de billes variant de 20 à 60 μm ; Tosohaas),

- matrices de N acryl amine hydroxyl propanédiol (Trisacryl d'un diamètre de billes compris entre 80 et 160 μm ; Biosépra), ou

- matrice d'agarose (Macro-Prep SE de diamètre de bille compris entre 20 et 80 μm ; Biorad).

A titre indicatif, on notera qu'un support de type Toyopearl HW65F, S (porosité 1000 Å) ou Séphacryl S400HR est préféré. Une telle colonne est équilibrée dans un tampon présentant des conditions salines et un pH limitant les interactions hydrophobes entre le support et les particules virales. Avantageusement, on utilisera un tampon Tris-HCl 25mM, MgCl_2 2mM, saccharose 2% à pH 8,5. Les particules virales d'intérêt sont éluées sans être retenues et sortent de la colonne avant les contaminants de poids moléculaire ou de taille inférieurs. Selon un mode de réalisation optionnel, les fractions virales obtenues après l'étape de purification peuvent être rassemblées et éventuellement concentrées selon les techniques habituelles. On peut citer l'ultrafiltration tangentielle et la diafiltration. Les cassettes BioMax PES (Millipore référence PXC300C50) et PLCMK (Millipore référence PXC300C52) conviennent tout particulièrement.

L'invention concerne également un protocole pour la production de particules virales utilisables pour la thérapie génique comprenant les étapes (i) et (ii) suivantes :

(i) obtention d'une préparation virale brute comprenant les étapes :

(a) infection ou transfection d'une lignée cellulaire appropriée par au moins un vecteur viral d'intérêt, préférentiellement recombiné;

(b) culture de ladite lignée cellulaire infectée ou transfectée dans des conditions permettant la replication virale et la production de particules virales ;

(c) collecte des cellules et/ou du surnageant,

5 (ii) purification de ladite préparation virale brute selon un procédé caractérisé en ce qu'il comporte au moins une étape d'adsorption en lit fluidisé telle que décrite précédemment.

Selon un cas particulier préféré, après l'étape (c) de collecte des cellules, on procède à une étape de cassage ou de lyse des cellules, généralement après resuspension de la biomasse cellulaire collectée, afin de permettre la libération des particules virales produites de manière
10 intracellulaire. Tous les moyens classiques peuvent être mis en œuvre, notamment les moyens chimiques et / ou mécaniques. On peut procéder par exemple à des cycles de congélation-décongélation qui fragilisent les membranes cellulaires, à une lyse enzymatique (emploi d'enzymes dégradant les membranes cellulaires) ou chimique (emploi de détergent, choc de pH...). Les moyens mécaniques peuvent résulter d'ultrason (sonication), d'attrition (billes de verre DynoMill,
15 BeadMill), de forces de pression et de cisaillement (homogénéiseur haute pression French Press), de microfluides (Microfluidics, Newton, MA) ou encore de l'action mécanique de deux cylindres générant des forces de cisaillement hydrauliques et mécaniques (homogénéiseur Silverson).

Toutefois, bien qu'elle ne soit pas exclue, cette étape de cassage/lyse des cellules n'est pas obligatoire dans le cas particulier où les particules virales sont libérées dans le milieu de culture.
20 Dans ce cas, l'étape (ii) peut être directement appliquée à l'échantillon renfermant à la fois les cellules et le milieu, ou exclusivement sur le surnageant de la culture qui renferme les particules virales à purifier.

En outre, le protocole pour la production de particules virales utilisables dans le cadre de protocoles de thérapie génique selon l'invention peut comprendre au moins une étape de dégradation
25 des acides nucléiques présents en quantités importantes après le cassage des cellules. A cet effet, les enzymes de restriction non spécifiques de type endo- ou exonucléases peuvent être employées. Selon un mode préféré, l'enzyme choisie est la benzonase, éventuellement en présence de β cyclodextrine qui facilite la précipitation des lipides (concentrations finales recommandées de 5 à 50 U/ml de benzonase et de 0,1 à 10 % et, en particulier, 1,5 % de β cyclodextrine).

30 Le protocole pour la production de particules virales selon l'invention peut également comprendre une étape de filtration stérilisante, ladite étape de filtration stérilisante étant de préférence réalisée après l'étape (c) dudit procédé de préparation. On aura avantageusement recours à des filtres de 0,22 μ m. On peut citer, par exemple, les unités de filtration de type Minisart (Sartorius, référence SM16534), Sartolab P20 (Sartorius, référence 18053D), Millex GF (Millipore, référence SLGS025BS),

Millex GV (Millipore, référence SLGV025BS), Millex GP (Millipore, référence SLGPR25LS) ou encore Spirale Cap (Version Super CQS 92 HS ou HP ; Gelman Sciences), Criticap 50 (12995, Gelman Sciences) ou Millipak (Millipore ref. MPGL04SK2 ou MPGL02SH2) .

De même, ce protocole peut en outre comprendre une étape de filtration en profondeur. Pour
 5 cela, de nombreux filtres peuvent être utilisés à la condition qu'ils aient une porosité permettant de
 laisser passer les particules virales d'intérêt et de retenir les insolubles. On indique que les particules
 adénovirales ont une taille d'environ 0,07 à 0,1 μm qui nécessitent l'utilisation de filtres de porosité
 supérieure. Par ailleurs, les filtres peuvent être en matière synthétique (nylon), organique (cellulose)
 ou non organique (zirconium). Selon un mode de réalisation avantageux, on procède à des filtrations
 10 successives sur des filtres de porosité décroissante, par exemple en premier lieu sur un filtre de
 porosité comprise entre 3 et 0,8 μm (Sartorius, Sartoclean CA capsule 5621304E9-00-A), puis sur
 un filtre de porosité comprise entre 0,8 et 0,65 μm (Sartorius, Sartoclean CA capsule 5621305G9-
 00-A). Selon une autre variante, la filtration peut être réalisée par microfiltration tangentielle sur
 membranes planes ou fibres creuses de porosité supérieure à la taille de l'adénovirus. A cet égard,
 15 les membranes Durapore (Millipore) et Omega (Pall) peuvent être employées.

Enfin, le protocole de l'invention peut également comprendre une étape facultative
 d'inactivation des virus à enveloppe. Cette étape permet, notamment dans le cas des préparations
 adénovirales d'améliorer la sécurité du produit final et d'augmenter la qualité de la préparation
 adénovirale purifiée. Un exemple d'étape d'inactivation de virus à enveloppe est donné dans la
 20 demande de brevet français No. 98/16147.

Le procédé de purification d'une préparation virale brute et le protocole pour la production
 de particules virales selon l'invention concernent notamment des préparations virales comprenant
 des particules virales d'intérêt pour des applications en thérapie génique, et notamment pour la
 préparation de préparations vaccinales, telles que par exemple des particules adénovirales,
 25 poxvirales, iridovirales, papovavirales, rotavirales, parvovirales, hépadnavirales, herpétiques,
 réovirales, coronavirales, flavivirales, togavirales, mononegavirales, arenavirales, bunyavirales,
 orthomyxovirales, calcivirales, picornavirales.. De préférence, ces particules virales renferment un
 virus recombiné. Selon la présente invention, la préparation virale brute que l'on cherche à purifier
 peut contenir une ou plusieurs particules virales d'origines virales différentes.

30 La mise en oeuvre des procédés et protocoles de l'invention est tout particulièrement adaptée
 à l'obtention de particules adénovirales purifiées comprenant des adénovirus recombinants défectifs
 pour la réplique. « Recombinant » fait référence à la présence d'au moins un gène d'intérêt placé
 sous le contrôle des éléments appropriés à son expression dans une cellule hôte. « Déficient pour la
 réplique » signifie que les informations génétiques disponibles ne permettent pas la réplique

autonome du virus considéré dans une cellule hôte. Dans ce cas, la production de particules virales requiert l'infection ou la transfection par tout moyen approprié, de cellules adaptées, dite cellules de complémentation, avec le virus déficient généralement recombiné. Ces cellules de complémentation fournissent *en trans* les informations nécessaires à la réplication et l'assemblage des virus déficients sous forme de particules virales. De telles lignées, ainsi que leur utilisation, sont largement décrites dans la littérature (voir par exemple les demandes WO 94/28152 ou WO 97/00326 ; la lignée 293, Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72 ; Lusky et al., 1998, J. Virol. 72, 2022-2032). D'autres virus pour leur part requièrent des conditions de culture cellulaire plus spécifiques mais parfaitement maîtrisées (voir par exemple VV, MVA, rétrovirus,...). Les cellules de complémentation infectées ou transfectées sont mises en culture dans des conditions largement décrites, pendant un temps suffisant pour permettre aux virus de se répliquer, et aux particules virales de s'assembler.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples ci-après. Toutefois, l'invention ne saurait se limiter au contenu desdits exemples.

EXEMPLES

Les adénovirus recombinants utilisés dans les exemples qui suivent, ont été construits par la technique de recombinaison homologue décrite dans Chartier et al. (1996, J. Virol. 70, 4805-4810). Les constructions mises en oeuvre ont été réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire, détaillées dans Maniatis et al., (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY ou une édition plus récente) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial. Les étapes de clonage utilisent la souche E. coli 5K (hsdR, mcrA), DH5a [(recA1, endA1, hsdR17 (r-m-), supE44 thi-1, gyrA (nalr)] ou NM522 (supE, thi, D(lac-proAB), Dhds5, (r-m-), (F' proAB, lacI^q, ZDM15) et celles de recombinaison homologue la souche E. coli BJ 5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580). S'agissant de la réparation des sites de restriction, la technique employée consiste en un remplissage des extrémités 5' protubérantes à l'aide du grand fragment de l'ADN polymérase I d'E. coli (Klenow, Boehringer Mannheim). Les fragments d'ADN sont purifiés à l'aide du kit de purification d'ADN GeneCleanII^R (Bio101Inc.). Par ailleurs, les fragments de génome adénoviral employés dans les différentes constructions sont indiqués précisément selon leur position dans la séquence nucléotidique du génome de l'Ad5 telle que divulguée dans la banque de données Genbank sous la référence M73260.

En ce qui concerne la biologie cellulaire, les cellules sont transfectées ou transduites et cultivées selon les techniques standards bien connues de l'homme du métier. On a recours aux lignées cellulaires 293 (ATCC CRL-1573), A549 E1+ (WO94/28152) et 293-E4ORF6+7 (Lusky et al., 1998, J. Virol. 72, 2022-2032). Il est entendu que d'autres lignées cellulaires peuvent être utilisées. Les cellules sont maintenues en culture à 37°C en atmosphère humide enrichie à 5% de

CO₂ dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL) complémenté avec 1 mM de glutamine, 1% d'acides aminés (Gibco BRL), 40mg/l de gentamycine et 10% de sérum de veau foétal (SVF, Gibco BRL). Les cellules sont transfectées selon les techniques de l'art (précipitation au phosphate de calcium...)

5 Les exemples qui suivent ont été réalisés à l'aide d'adénovirus recombinants exprimant un gène marqueur ou un gène thérapeutique. Ils sont dérivés du sérotype Ad5 et ont la structure suivante :

10 -AdTG6297 est un vecteur adénoviral défectif pour les fonctions E1 (délétion des nt 459 à 3328) et E3 (délétion du fragment XbaI s'étendant des nt 28592 à 30470) dans le génome duquel est inséré en remplacement de la région E1, une cassette d'expression du gène marqueur codant pour la protéine GFP (pour green fluorescent protein). Celle-ci réagit à l'excitation lumineuse (485 nm) par l'émission d'une lumière fluorescente dont on mesure l'intensité au moyen d'un filtre (535 nm). Plus précisément, la cassette est composée du promoteur CMV suivi d'un intron chimère, de la séquence codant pour la protéine GFP et le polyA du virus SV40. Les séquences introniques sont isolées du plasmide pCI (Promega Corp, pCI mammalian expression vector E1731) et comprennent le site donneur d'épissage de l'intron 1 du gène β -globine humaine ainsi que le point de branchement et le site accepteur d'épissage du gène d'une immunoglobine de souris. Les particules virales sont produites par transfection du vecteur AdTG6297 dans une lignée de complémentation de E1 (293 ou A549 E1+) et amplifiées par passages successifs sur une lignée permissive (complémentant E1).

20 -Le vecteur AdTG5643 est un vecteur délété des régions E1 (nt 459 à 3328), E3 (nt 28592 à 30470) et E4 (nt 32994 à 34998) et exprimant le gène thérapeutique CFTR humain. La cassette d'expression est constituée du promoteur précoce CMV, de l'ADNc CFTR et du poly A du gène β -globine de lapin et est insérée à la place des séquences E1 délétées. Les particules virales sont produites par transfection du vecteur AdTG5643 dans une lignée de complémentation de E1 et E4 (293-E4ORF6+7) et un stock viral constitué par passages successifs sur une lignée permissive (complémentant E1 et E4).

EXEMPLE 1 : Préparation de virus à partir des cellules de complémentation.

30 Les cellules A549-E1+ sont cultivées en boîtes de culture jusqu'à atteindre une concentration de 1×10^8 cellules/ml et sont ensuite infectées avec un préstock d'AdTG6297 à raison d'une MOI d'environ 3. Les cellules infectées sont récoltées à 72 h post infection et centrifugées à basse vitesse. Le culot est repris dans environ 600 ml de milieu de culture sans sérum. La préparation ainsi obtenue correspond à un volume d'environ 20 l de culture.

Les particules virales intracellulaires sont libérées après cassage des cellules soumises à

l'action mécanique pendant 7 à 10 min d'un homogénéiseur Silverson (L4R- Silverson) réglé à une vitesse de rotation de 4200 tours/min.

A ce stade, la préparation est très visqueuse du fait de la libération de l'ADN génomique suite au cassage cellulaire. On ajoute à la préparation virale un volume d'un tampon permettant une action optimale de la benzonase et constitué de Tris 100 mM, $MgCl_2$ 4 mM, saccharose 4% pH 8,5 auxquels a été ajouté l'agent de solubilisation Tween 80 (Merck référence 8-22187-1000) à une concentration de 2%. Le mélange est mis sous agitation à température ambiante avant d'ajouter la benzonase à raison de 50 U/ml (Merck référence 101697) et on laisse la réaction se poursuivre pendant 1 à 2 h à température ambiante et sous agitation.

EXEMPLE 2 : Préparation de virus à partir de la culture cellulaire.

L'exemple 1 est reproduit à la différence que l'on récolte 72 h post infection les cellules et le surnageant de culture (volume d'environ 20 l) et l'ensemble est directement soumis à l'étape de cassage pour obtenir la préparation virale brute à purifier.

EXEMPLE 3 : Purification de la préparation virale brute à l'aide d'une étape de chromatographie en lit fluidisé.

L'exemple 3 a pour but d'illustrer un mode de réalisation du procédé selon l'invention pour l'obtention de particules virales purifiées.

Dans un premier temps, l'une quelconque des préparations virales brutes obtenues aux exemples 1 et 2 est soumise à une étape d'inactivation des virus enveloppés. Cette étape d'inactivation est réalisée par action du TNBP/Tween 80 (Tributyl phosphate Réf. : 24 0494 Aldrich) à une concentration finale de 0,3 % et 1% respectivement. Pour ce faire, la préparation virale brute obtenue à l'exemple 1 ou 2 est diluée volume à volume dans une solution tampon de Tris 50 mM, $MgCl_2$ 2 mM, saccharose 2% NaCl 450 mM et TNBP 0,6 % (Aldrich 24-049-40), pH 8,5. Il est également possible d'ajouter à la préparation virale 1/10 de volume d'un tampon plus concentré Tris 50 mM, $MgCl_2$ 2 mM, saccharose 2%, NaCl 2 M et TNBP 3 % (Aldrich 24-049-40), pH 8,5. Il faut remarquer que les conditions salines utilisée (NaCl 400mM final) correspondent aux conditions d'équilibration de la chromatographie. L'action du TNBP / Tween 80 se poursuit sous agitation (500 rpm) pendant 3 heures à température ambiante ou pendant 4 heures à 4°C.

La préparation virale brute inactivée est ensuite soumise à une chromatographie d'échange d'ions en lit fluidisé. Pour ce faire, la préparation virale est chargée sur une colonne contenant une résine de type Streamline® QXL (Réf. Pharmacia 17-5075-01) préalablement équilibrée à l'aide d'un tampon Tris 50 mM, $MgCl_2$ 2mM, saccharose 2%, NaCl 400 mM, pH 8,5. L'introduction du tampon se fait à la base de la colonne de chromatographie et sa sortie s'opère au sommet de la

colonne, de manière à créer un courant de tampon ascendant dans la colonne. Un débit de 100 à 300 cm/h, et de préférence 150 cm/h est utilisé pour équilibrer et charger la colonne avec la préparation virale brute à purifier. La préparation virale appliquée sur la colonne est alors rincée par différents passages de solution tampon dans le sens ascendant et descendant. Cette opération a pour but d'éliminer une première gamme de contaminants adsorbés par des interactions non ions-spécifiques ou mécaniquement coincés. Les différents constituants cellulaires adsorbés par des interactions ions-spécifiques sur le support de chromatographie sont ensuite élués progressivement par application d'un tampon d'équilibrage contenant des concentrations de sel croissantes (NaCl 425 mM, 450 mM, 500 mM). Un débit de 50 à 150 cm/heure et de préférence de 100 cm / heure est appliqué à partir du moment où le flux de tampon est descendant. L'éluat est recueilli en fractions. Chaque fraction est analysée par mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm. Généralement, les protéines qui sont détectées uniquement à 280 nm, sont éluées par le tampon contenant une concentration en NaCl de 425 mM. Un second pic d'élution est détecté à 280 et 260 nm. Il contient les particules adénovirales d'intérêt et est élué par le tampon de concentration saline 450 mM. Les fractions correspondant à ce second pic d'élution sont rassemblées et éventuellement soumises à une chromatographie de gel filtration.

La colonne de chromatographie en lit fluidisé peut être régénérée, lavée et traitée par l'enchaînement d'étapes montré dans le tableau 1 :

Tableau 1

Solution	Concentration	Volume de colonne (Vc)	Débit (cm/h)	Sens
NaCl	1,5 M	4	100	Descendant
HCl	0,05 N	9	30	Ascendant
H ₂ O	—	6	100	Ascendant
NaOH	1 N	12	30	Ascendant
NaCl	3 M	9	30	Ascendant
Tris-HCl	10 mM	9	30	Ascendant
EDTA	1 mM			
PH 8,0				

Le gel peut être ensuite stocké dans NaOH 0,01 M pendant plusieurs semaines.

Le rendement d'un procédé d'obtention des particules virales peut être calculé de

Le rendement d'un procédé d'obtention des particules virales peut être calculé de la manière suivante :

Etapes	UI totales x 10 ¹³	Rendement - % (global)	Rendement -% (étape)
Départ	2,69	100	-
Benzonase	2,74	102	102
Inactivation	2,58	96	94
SQXL	2,11	78	82

5

UI représente le nombre d'unités infectieuses

Le procédé de l'invention permet de purifier un volume de l'ordre de 20 litres de préparaton virale brute tout en obtenant un rendement global d'environ 80% après l'étape de chromatographie en lit fluidisé alors que les procédés de l'art antérieur permettent au mieux d'obtenir des rendements de l'ordre de 60 % après l'étape de chromatographie en lit paqué.

10

REVENDICATIONS

1. Procédé de purification d'une préparation virale brute renfermant des particules virales d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une étape d'adsorption en lit fluidisé.
- 5 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit lit fluidisé renferme des particules d'adsorbant et est obtenu par la mise en suspension dans un fluide desdites particules sous l'action d'une ou plusieurs forces sélectionnées parmi les forces mécanique, électromagnétique, magnétique, gravitationnelle et électrique.
- 10 3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que lesdites particules d'adsorbant sont constituées de matériaux composite.
4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit matériaux composite est choisi parmi la silice, la dextrane-silice ou la cellulose-titane-dioxyde.
5. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que lesdites particules d'adsorbant sont constituées de polymère.
- 15 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit polymère est choisi parmi l'agarose, le polyacrylamide, le polystyrène ou leurs dérivés.
7. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que lesdites particules d'adsorbant comprennent un noyau central.
- 20 8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que ledit noyau central consiste en un noyau de quartz, un noyau de métal inerte ou en un noyau dont la composition permet auxdites particules d'adsorbant d'être maintenues en suspension dans le fluide par l'application d'un champ magnétique, électrique ou électromagnétique.
- 25 9. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que lesdites particules d'adsorbant portent au moins un ligand capable de se lier de manière spécifique et réversible à un anti-ligand, ledit anti-ligand consistant en tout ou partie d'une dite particule virale d'intérêt.
- 30 10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit ligand consiste en tout ou partie d'un polypeptide, notamment tout ou partie d'un anticorps, et en ce que ledit anti-ligand consiste en tout ou partie d'une protéine de ladite particule virale d'intérêt.
11. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit ligand consiste en un groupement chargé positivement, avantageusement un groupement basique.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que ledit groupement chargé positivement est sélectionné parmi les groupements diméthylaminoéthyl (DMAE), diéthylaminoéthyl (DEAE), triméthylaminoéthyl (TMAE), $-R-CH(OH)-CH_2-N^+(CH_3)_3$, guanidinium ou imine tels que la polyéthylèneimine (PEI).
- 5 13. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit ligand consiste en un groupement chargé négativement.
14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que ledit groupement chargé négativement est sélectionné parmi les groupements sulfate de formule $R-SO_4^-$, carboxylate de formule $R-COO^-$ ou phosphate de formule $R-PO_4^-$ avec par exemple R = groupes alkyles.
- 10 15. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il est réalisé à un pH compris entre environ 6 et environ 10, avantageusement entre environ 7.5 et environ 9.5 et, de façon préférée sera d'environ 8.5.
16. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il est réalisé à un pH compris entre environ 3.0 et environ 5.0.
- 15 17. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est réalisé à une température comprise entre -5 et $+50^\circ\text{C}$, avantageusement comprise entre environ $+4^\circ\text{C}$ et $+37^\circ\text{C}$ et préférentiellement entre environ $+15^\circ\text{C}$ et $+25^\circ\text{C}$.
18. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est réalisé dans des conditions de conductivité comprises entre environ 30 et environ 70 mS/cm, avantageusement entre environ 38 et environ 45 mS/cm et, de préférence, entre environ 40 et environ 43 mS/cm.
- 20 19. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que lesdites particules d'adsorbant présentent des tailles hétérogènes entre elles.
- 20 20. Protocole pour la production de particules virales utilisables pour la thérapie génique comprenant les étapes (i) et (ii) suivantes :
- 25 (i) obtention d'une préparation virale brute comprenant les étapes :
- (a) infection ou transfection d'une lignée cellulaire appropriée par au moins un vecteur viral d'intérêt, préférentiellement recombiné;
- (b) culture de ladite lignée cellulaire infectée ou transfectée dans des conditions
- 30 permettant la replication viral et la production de particules virales ;

(c) collecte des cellules et/ou du surnageant,

(ii) purification de ladite préparation virale brute selon l'un des procédés des revendications 1 à 19.

5 21. Protocole selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape de cassage ou de lyse des cellules après l'étape (c).

22. Protocole selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape de dégradation des acides nucléiques après l'étape de cassage ou de lyse des cellules.

23. Protocole selon les revendications 20 à 22, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'inactivation des virus à enveloppe.

10 24. Procédé selon les revendications 1 à 19 ou protocole selon les revendications 20 à 23, caractérisé en ce que lesdites particules virales sont des particules adénovirales.

ORIGINAL



là ne sont pas satisfaisants en ce qu'ils comprennent des étapes limitantes au niveau du volume de préparation virale brute à purifier (ultracentrifugation) et / ou par leur nombre trop important qui se traduit par une baisse du rendement global de l'ordre de 5 à 20% ne permettant pas de satisfaire une exploitation à l'échelle industrielle.

5 On a maintenant mis au point un nouveau procédé de purification d'une préparation virale brute parfaitement adapté à la production industrielle de particules virales destinées aux applications de thérapie génique.

10 La présente invention concerne en premier lieu un procédé de purification d'une préparation virale brute, renfermant des particules virales d'intérêt, notamment adénovirales, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une étape d'adsorption en lit fluidisé.

 Le principe de l'adsorption en lit fluidisé est brièvement exposé ci-après. Des explications plus détaillées sont disponibles dans « Expanded Bed Adsorption , Principles and Methods » - Pharmacia Biotech - Edition AA ainsi que dans le brevet US 5,522,993.

15 A l'inverse de l'adsorption en lit paqué pour laquelle des particules solides d'adsorbant sont sédimentées ou compactées les unes contre les autres, l'adsorption en lit fluidisé repose sur le principe selon lequel des particules solides d'adsorbant comprises dans ledit lit fluidisé sont maintenues en suspension dans un fluide (gazeux ou liquide) générant ainsi entre elles des espaces libres. Cette suspension des particules d'adsorbant est obtenue par l'action d'une ou plusieurs forces (mécanique, électromagnétique, magnétique, gravitationnelle, électrique...). La
20 suspension des particules d'adsorbant dans un fluide liquide ou gazeux peut par exemple être obtenue par la combinaison d'un courant dudit fluide dirigé de manière opposée au champ gravitationnel auquel sont naturellement soumises les particules d'adsorbant. La direction et l'intensité des deux forces sont aisément choisies par l'homme de l'art afin de maintenir les particules d'adsorbant en suspension. De même, il est possible d'utiliser des particules
25 d'adsorbant qui présentent une composition particulière qui les rend sensibles à une force magnétique ou/et électrique et permet ainsi d'obtenir une suspension de particules d'adsorbant comme précédemment décrite. Enfin, il est également possible de disposer de particules d'adsorbant qui présentent elles-mêmes une charge magnétique ou électrique suffisante pour permettre leur mise en suspension dans des conditions appropriées. L'homme du métier dispose
30 des connaissances nécessaires à la réalisation de ces variantes de l'invention.

 L'expansion, ou mise en suspension, des particules d'adsorbant génère l'apparition d'espaces entre lesdites particules qui permettent le passage des cellules, débris cellulaires ou autres particules indésirables que l'on souhaite éliminer de la préparation virale brute.

